



TITLE:

# Architecture of the BBosome and its role in ciliary protein trafficking( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Nozaki, Shohei

---

CITATION:

Nozaki, Shohei. Architecture of the BBosome and its role in ciliary protein trafficking. 京都大学, 2019, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21709>

RIGHT:

許諾条件により本文は2020-03-01に公開; This research was partly published in Journal of Cell Science and Plos One. Yohei Katoh, Shohei Nozaki, David Hartanto, Rie Miyano, and Kazuhisa Nakayama Architectures of multisubunit complexes revealed by a visible immunoprecipitation assay using fluorescent fusion proteins. J. Cell Sci. 2015; 128: 2351-2362. doi:10.1242/jcs.168740 ; Shohei Nozaki, Yohei Katoh, Takuya Kobayashi, and Kazuhisa Nakayama. BBS1 is involved in retrograde trafficking of ciliary GPCRs in the context of the BBosome complex. PLoS ONE. 2018; 13: e0195005. doi: 10.1371/journal.pone.0195005

京都大学	博 士（薬科学）	氏 名	野崎 梢平
論文題目	Architecture of the BBSome and its role in ciliary protein trafficking （BBSome の構築様式と繊毛内タンパク質輸送における役割）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>動物のほぼ全ての細胞に存在する繊毛は、微小管を骨格に持ち、細胞膜から突出するアンテナ様のオルガネラである。繊毛は、繊毛膜上に存在する受容体やイオンチャネルを介して、光や液体の流れなどの外部刺激の感知や、ヘッジホッグ分子などのシグナルの受容と伝達に関与する。繊毛特異的な受容体の局在が損なわれて繊毛機能が異常になると、網膜色素変性症、多指症、病的肥満、精神遅滞など多岐にわたる症状を呈する「繊毛病」と総称される遺伝性疾患が発症する。繊毛病には、バルデー・ビードル症候群（BBS）やジュベール症候群、メッケル症候群などがある。</p> <p>繊毛に局在する受容体などのタンパク質の輸送は、2 MDa を超える巨大なタンパク質複合体（IFT 装置）によって媒介される。IFT 装置は、モータータンパク質のキネシンと共役して繊毛内の順行輸送を担う IFT-B 複合体、およびダイニンと共役して逆行輸送を担う IFT-A 複合体から成る。さらに、輸送される受容体と IFT 装置は、BBSome という別のタンパク質複合体によって連結される。しかし、これらの巨大な複合体自体の構築様式や、複合体どうしの連結様式は解明されておらず、繊毛内タンパク質輸送の分子基盤は不明であった。</p> <p>そこで著者は、BBSome に着目し、その構築様式および他の複合体との相互作用様式を明らかにし、繊毛に局在する受容体の輸送の分子基盤の解明することを目指して以下の研究を行った。</p>			
<p><b>第一章 BBSome の構築様式に基づく機能の解析</b></p> <p>著者はまず、従来の方法では困難であった多数のサブユニットから成る複合体の構築様式でも簡単に調べることができる VIP（<u>v</u>isible <u>i</u>mmunoprecipitation）アッセイの開発に携わり、BBSome を構成する 8 つのサブユニット（BBS1/BBS2/BBS4/BBS5/BBS7/BBS8/BBS9/BBS18）の間の相互作用を網羅的に調べた。それによって、BBSome の複雑な構築の全体像を明らかにした。また、BBS1 を介して BBSome と相互作用することがわかっていた低分子量 GTPase の ARL6 が、実際には BBS1-BBS9 二量体と相互作用することを明らかにした。さらに、ARL6 と BBS9 は、BBS1 の別々の領域（それぞれ N 末端領域と C 末端領域）を介して相互作用することもわかった。</p> <p>次に著者は、BBSome の機能を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて BBS1 ノックアウト（KO）細胞を樹立した。BBS1-KO 細胞において、BBS9 や ARL6 は繊毛内に全く局在できなくなるとともに、ヘッジホッグシグナル依存的に繊毛から排出される GPCR である GPR161 が繊毛から全く排出されなくなった。これらの結果から、BBSome は繊毛局在型受容体の繊毛からの排出に関与することが示唆された。</p> <p>次に、野生型 BBS1、あるいは相互作用パートナーである ARL6 や BBS9 と相互作用できない BBS1 の変異体を BBS1-KO 細胞に発現させて、細胞の表現型を解析した。BBS9 と相互作用できない BBS1 変異体を発現させた BBS1-KO 細胞において、</p>			

GPR161 の排出不全は全く回復しなかったことから、BBS1 と BBS9 の相互作用は BBSome の機能において必須であることがわかった。一方、ARL6 と相互作用できない BBS1 変異体を発現させた細胞において、GPR161 の排出不全は回復した。さらに詳しく調べると、BBS1 と BBS9 が相互作用することによって、BBS1 と ARL6 の相互作用が増強されること、および ARL6 と相互作用できない BBS1 変異体は BBS9 存在下では ARL6 と相互作用できるようになることがわかった。これらの結果から、BBS1 と BBS9 の相互作用は BBS1 と ARL6 の相互作用の安定化に寄与し、BBSome の機能において必須の役割を果たすことが明らかになった。

## 第二章 IFT-B 複合体と BBSome の相互作用は繊毛に局在する G タンパク質共役型受容体の排出に必要である

第一章で、BBSome が繊毛に局在する受容体の排出に必要であることがわかった。しかし、BBSome 自体はモータータンパク質とは相互作用しないので、BBSome が IFT 装置と相互作用することによって受容体の排出を媒介する可能性が考えられる。そこで、BBSome と IFT-A 複合体、BBSome と IFT-B 複合体の間の相互作用を VIP アッセイにより調べた。その結果、BBSome と IFT-B 複合体が相互作用することが明らかになった。VIP アッセイを用いてさらに詳しく調べることによって、BBSome の BBS1-BBS9 二量体が、IFT-B 複合体のサブユニット IFT38 と相互作用することがわかった。さらに、IFT38 のさまざまな欠失変異体を用いた解析によって、IFT38 の C 末端領域を欠失した変異体 IFT38( $\Delta$ C)は、他の IFT-B サブユニットとの相互作用は維持しているが、BBS1-BBS9 二量体とのみ相互作用できないことがわかった。

次に、CRISPR/Cas9 システムを用いて IFT38-KO 細胞を樹立し、野生型 IFT38 および IFT38( $\Delta$ C)変異体をそれぞれ IFT38-KO 細胞に発現させて、表現型の解析を行った。すると、野生型 IFT38 を発現させた細胞では GPR161 は繊毛から正常に排出されるのに対して、IFT38( $\Delta$ C)発現細胞では GPR161 の排出は抑制された。また、BBS9 や ARL6 の局在を観察すると、野生型 IFT38 発現細胞と IFT38( $\Delta$ C)発現細胞のどちらにおいてもこれらは正常に繊毛内に局在していた。以上の結果から、IFT38 と BBS1-BBS9 二量体を介する IFT-B 複合体と BBSome の相互作用は、BBSome 自体の繊毛内への輸送にとって必須ではないが、BBSome による GPR161 の排出において必須の役割を果たすことが明らかになった。

## (論文審査の結果の要旨)

動物のほぼ全ての細胞に存在する繊毛は、繊毛膜に存在する受容体やイオンチャネルを介して外部刺激やシグナルを受容し、細胞内に伝達するアンテナのような役割を担うオルガネラである。繊毛を介したシグナル伝達は発生や恒常性維持にとって重要であるため、繊毛機能の破綻は多指症や嚢胞腎、網膜色素変性症など種々の症状を呈する「繊毛病」と総称される多様な遺伝性疾患を引き起こす。繊毛内タンパク質の輸送は、モータータンパク質と結合する IFT 装置やバルデー・ビードル症候群 (BBS) の原因遺伝子から構成される BBSome という巨大なタンパク質複合体によって行われている。また、IFT 装置は、キネシンと共役して繊毛内順行輸送を担う IFT-B 複合体とダイニンと共役して逆行輸送を担う IFT-A 複合体に分けられる。しかしながら、これらの複合体自体の構築様式や、複合体同士の連結様式は解明されておらず、繊毛内タンパク質輸送の分子基盤は不明であった。そこで著者は、タンパク質間相互作用解析を迅速に行える VIP アッセイの開発に携わり、BBSome の構築様式や、BBSome と IFT 装置の相互作用を詳細に解析することで、BBSome による繊毛内膜タンパク質の輸送機構の分子基盤の解明を目指した。

第一章において、著者は VIP アッセイを用いて BBSome の 8 つのサブユニット同士の相互作用を網羅的に解析し、BBSome の構築様式を明らかにした。さらに著者は、共通のドメイン構成をもち、BBSome のコアサブ複合体を形成する BBS1、BBS2、BBS7、BBS9 の相互作用様式を、各サブユニットの欠失変異体を用いた VIP アッセイにより解析し、コアサブ複合体の構築様式をより詳細に解明した。また、BBSome と相互作用することが知られていた低分子量 GTPase である ARL6 が BBS1 の N 末端領域を介して相互作用することを明らかにした。次に著者は、BBSome の繊毛における機能を調べるために、BBS1 ノックアウト (KO) 細胞を CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。BBS1-KO 細胞における IFT 装置の局在は正常であったが、BBSome が繊毛に全く局在せず、繊毛膜に局在する GPCR である GPR161 の排出を抑制された。これらのことから、BBS1 は BBSome の構築に必要であり、BBSome は GPR161 の繊毛外への排出に必要であることが明らかになった。また、BBS1-KO による GPR161 の排出不全は、野生型 BBS1 を発現させることで回復するが、BBS9 と相互作用できない BBS1 変異体では回復しなかった。このことから、BBS1 と BBS9 の相互作用は BBSome の機能にとって必要であることが示された。次に、著者が ARL6 と相互作用できない BBS1 点変異体を用いて同様のレスキュー実験を行ったところ、GPR161 の排出不全は、ARL6 と相互作用できない BBS1 点変異体を発現させることで回復した。著者は、この原因として、他の BBSome サブユニット存在下では BBS1 点変異体が ARL6 と相互作用できるようになるのではないかと考え、BBS1 と ARL6 の相互作用についてさらに詳細な相互作用解析を行った。すると、BBS1 と ARL6 の相互作用は BBS9 共発現下において増強されることや、BBS9 存在下では ARL6 と相互作用できない BBS1 点変異体が ARL6 と相互作用できることがわかった。以上の結果から、BBS1 と BBS9 の相互作用は BBS1 と ARL6 の相互作用の安定化に寄与し、BBSome の機能において必須の役割を果たすことが明らかになった。

第一章において、BBS1-KO 細胞では GPR161 の排出が抑制されたにも関わらず、繊毛内輸送を司る IFT 装置の局在が正常であったことから、第二章において著者は、BBSome が IFT 装置と GPR161 を連結している可能性について検討した。まず著者は、VIP アッセイを用いて、BBSome と IFT 装置が BBS1-BBS9 二量体と IFT-B 複合

体のサブユニットである IFT38 を介して相互作用していることを明らかにした。さらに、IFT38 の C 末端領域を欠失した変異体 IFT38( $\Delta$ C)は、他の IFT-B サブユニットとの相互作用は維持しているが、BBS1-BBS9 二量体とのみ相互作用できないことを明らかにした。そこで、IFT38-KO 細胞において、野生型 IFT38 と IFT38( $\Delta$ C)をそれぞれ発現させたレスキュー細胞を作製した。BBSome の繊毛内局在は、どちらのレスキュー細胞においても正常であった。一方、GPR161 の排出は、野生型 IFT38 レスキュー細胞では正常に行われるのに対して、IFT38( $\Delta$ C)レスキュー細胞では正常に行われず、GPR161 の排出が抑制された。以上の結果から、IFT38 と BBS1-BBS9 二量体を介する IFT 装置と BBSome の相互作用は、BBSome 自体の繊毛内への輸送にとって必須ではないが、BBSome による GPR161 の排出において必須の役割を果たすことが明らかになった。

以上、著者は、VIP アッセイを用いた相互作用解析と、その相互作用解析に基づく KO 細胞のレスキュー実験を行うことによって、まず BBSome の構築様式を明らかにし、BBSome が GPR161 の排出にとって必要であることを明らかにした。次に著者は、BBSome が、GPR161 が繊毛から排出される際に、GPR161 と IFT 装置をつなぐアダプターとして機能することを明らかにした。本研究の成果は、BBSome による繊毛局在型 GPCR の排出機構やその破綻による BBS 発症機構における重要な知見を見出すだけでなく、VIP アッセイを用いたタンパク質複合体の相互作用解析とそれに基づく機能解析の典型を提示している。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年2月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。